

UNIVERSIDAD SAN PEDRO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
PROGRAMA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



**Determinación de la presencia de fragmentos de los
inhibidores de la PDE-5 en medicamentos para la
disfunción eréctil, Universidad Médica de Varsovia, 2018**

Tesis Para Obtener el Título de Químico Farmacéutico

Autores:

Br. Holguin Moncada Jossely Fiorella

Br. Ruiz Aguirre Claudia Valeria

Asesor:

Mg. Carol Torres Solano

CHIMBOTE – PERÚ

2019

i.- Palabras clave

Tema	Fragmentos - Inhibidores de la PDE-5.
Especialidad	Farmacia y Bioquímica

Keywords

Subject	Fragments - PDE5 inhibitors.
Speciality	Pharmacy and Biochemistry

Línea de Investigación	Farmacia clínica y comunitaria
Área	Ciencias médicas y de salud.
subarea	Ciencias de la Salud
Disciplina	Ciencias del Cuidado de la Salud y Servicios

ii.- Título

“Determinación de la presencia de fragmentos de los inhibidores de la PDE-5 en medicamentos para la disfunción eréctil, Universidad Médica de Varsovia, 2018.”

iii. Resumen

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar la presencia de fragmentos de los inhibidores de la PDE-5 en medicamentos utilizados para la disfunción eréctil de dudosa procedencia. El tipo de estudio fue diseño Descriptivo, cuantitativo. Se desarrolló en el Laboratorio del Departamento de Bioanálisis y Análisis de Drogas, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Médica de Varsovia, 2018. Con 54 muestras del grupo farmacoterapéutico inhibidores de la PDE-5, El instrumento que se utilizó es el Analizador Manual TruScan el cual proporcionó los resultados basados en los algoritmos apropiados y el valor p determinado. Luego con el espectrómetro de masas en tándem se analizó la separación de iones según su relación masa / carga (m/z). Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el programa Compounds Discover, donde se analizaron los fragmentos encontrados, a través del análisis de la presencia de cada parámetro, los cuales fueron expresados en tablas y figuras.

Palabras clave: Fragmentos - Inhibidores de PDE-5

iv. Abstract

The purpose of this work was to determine the presence of fragments of PDE-5 inhibitors in drugs used for erectile dysfunction of doubtful origin. The type of study was descriptive, quantitative design. It was developed in the Laboratory of the Department of Bioanalysis and Drug Analysis, of the Faculty of Pharmacy of the Medical University of Warsaw, 2018. With 54 samples of the pharmacotherapeutic group inhibitors of PDE-5, the instrument that was used it the Manual Analyzer TruScan which provided the results based on the appropriate algorithms and the determined p-value. Then with the tandem mass spectrometer the ion separation was analyzed according to its mass/ charge ratio (m/z). The data obtained were evaluated through the analysis of the presence of each parameter, which were expressed in tables and figures.

Keywords: Fragments - PDE-5 inhibitors

	Pág
Palabras clave- Línea de investigación	i
Título de la investigación	ii
Resumen	iii
Abstract	i v
Índice	v
Introducción	1
Antecedentes y fundamentación científica	1
Justificación de la investigación	3
Problema	4
Marco Referencial	5
Hipótesis	9
Objetivos	9
Metodología	10
Tipo y Diseño de investigación	10
Población – Muestra	10
Técnicas e instrumentos de investigación	11
Resultados	17
Análisis y Discusión	34
Conclusiones	39
Recomendaciones	40
Agradecimientos	41
Referencias Bibliográficas	42
Anexos y Ápendice	44

I. INTRODUCCIÓN:

1. Antecedentes y fundamentación científica:

Gratz, Flurer, y Wolnik (2004), realizaron la investigación titulada: Análisis de inhibidores de la fosfodiesterasa-5 sintéticos no declarados en suplementos dietéticos y matrices de hierbas mediante LC – ESI – MS y LC – UV. Se desarrolló un método de cromatografía líquida-ionización electrospray-espectrometría de masas (LC-ESI-MS) para detectar la presencia de inhibidores de la fosfodiesterasa sintética tipo 5 (PDE-5), incluidos Sildenafil, Tadalafil y Vardenafil. El método se aplicó al análisis de suplementos dietéticos y a granel. Se prepararon polvos a granel o compuestos de comprimidos, cápsulas o líquidos y se realizó una extracción de inhibidores de PDE-5 utilizando una mezcla de acetonitrilo y agua con sonicación. La identificación de sildenafil, vardenafil o tadalafil se realizó mediante un solo cuadrupolo Espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de líquidos con una interfaz de electrospray. Se utilizó la detección de iones positivos en el modo de exploración completa, mientras que la disociación inducida por colisión en la fuente (CID) proporcionó varios iones de fragmentos estructuralmente significativos para ayudar en la identificación espectral de masas. Se encontró que aproximadamente la mitad de los 40 productos botánicos analizados contenían inhibidores sintéticos de PDE-5 no declarados. Para los productos que contienen uno de estos tres compuestos por LC-MS, se usó HPLC con detección UV para la cuantificación.

Zhang (2010) en su investigación titulada: Determinación simultánea de yohimbina, sildenafil, vardenafil y tadalafil en suplementos dietéticos utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas en tándem, Desarrollaron un método simple y sensible para la determinación de adulterantes ilegales (yohimbina, sildenafil, vardenafil y tadalafil) en los suplementos dietéticos por HPLC-MS / MS. La separación se logró en una columna C₁₈ con la fase móvil que consiste en acetonitrilo y solución acuosa de ácido acético al 0,1% con un gradiente de elución a un caudal de 0,5 ml / min. Los analitos se cuantificaron e identificaron mediante dos transiciones características utilizando el modo de monitoreo de reacción múltiple. Las recuperaciones de los analitos oscilaron entre el 77,5 y el 109,3% con un RSD inferior al 8,1% (n = 6). El método se ha aplicado con éxito para detectar adulteraciones ilegales de suplementos dietéticos naturales.

Fijalek, Poplawska, Blazewicz y Bukowinska (2013) realizaron la investigación titulada: Aplicación de cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de aerosoles cargados para la cuantificación universal de no declarados Inhibidores de la fosfodiesterasa-5 en suplementos dietéticos a base de hierbas. Este estudio presentó una nueva estrategia de análisis cuantitativo de compuestos desconocidos y recientemente identificados. El detector de aerosol cargado (CAD), descrito como "detector universal", combinado con un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) demostró ser una herramienta útil para la cuantificación rápida y simple de los análogos de los inhibidores de la PDE-5 en una matriz herbaria compleja sin Estándares de referencia disponibles. Dos materiales de referencia fácilmente obtenibles, sildenafil y tadalafil, se seleccionaron como estándares universales y el contenido de los análogos se estimó con respecto a su respuesta. Los resultados obtenidos indican que la cantidad de inhibidores de PDE-5 en todas las muestras analizadas se considera farmacológicamente relevante. Se encontró que el error de la determinación indirecta propuesta fue de $\pm 3\%$, lo que es menos que suficiente para obtener un resultado confiable del contenido. El método elaborado se aplicó para análisis cuantitativos de inhibidores de PDE-5 y 10 análogos detectados en 22 suplementos dietéticos ilícitos y dos materiales herbales en polvo a granel. Todos los análogos de destino se identificaron usando espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización por electrospray.

Zou, Sze-Yin, Hou, Low, y Koh (2006) realizaron la investigación titulada: Determinación simultánea de inhibidores de la fosfodiesterasa sintética-5 encontrados en un suplemento dietético y polvos a granel premezclados para suplementos dietéticos que utilizan cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de matriz de diodos y cromatografía líquida: ionización por electropulverización espectrometría de masas en tándem. Este estudio desarrolló un método de alto rendimiento para la cromatografía líquida-detección de matrices de diodos (HPLC-DAD) y un método de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización (LC-ESI-MS / MS) para detectar la presencia de fosfodiesterasa sintética-5 (PDE). -5) inhibidores y sus análogos, a saber, sildenafil, vardenafil, tadalafil, homosildenafil, acetildenafil y hydroxyhomosildenafil. Los métodos se aplicaron a muestras de pre-mercado

enviadas a la Health Sciences Authority of Singapore (HSA) para su análisis. Una muestra estaba en forma de cápsulas, mientras que otras seis muestras eran muestras de polvo en masa premezcladas para los suplementos dietéticos que se volverían a empaquetar o formularían en las formas de dosificación finales (generalmente cápsulas). La identificación de los inhibidores de la PDE-5 y sus análogos se logró mediante la comparación de los tiempos de retención máximos individuales, Espectros UV y espectros de masas con los de los estándares de referencia. Se encontró que las siete muestras contenían al menos uno de los siguientes compuestos: sildenafil, vardenafil, hidroxihomosildenafil, homosildenafil y acetildenafil. Los cinco compuestos se determinaron simultáneamente mediante LC – ESI – MS / MS en el modo de exploración de monitoreo de múltiples reacciones (MRM). El método ha sido validado por su precisión, precisión, linealidad y sensibilidad.

2. Justificación de la Investigación:

La investigación se justifica, con el estudio que permitió obtener la presencia de fragmentos de los inhibidores de la PDE-5 en los medicamentos de dudosa procedencia que fueron recolectados como evidencias por la policía, ya que estos son comercializados y vendidos por internet formando así una red de medicamentos de dudosa procedencia dañando la salud de el paciente que accede a la compra de estos. Debido al contenido inadecuado de los excipientes, los medicamentos de dudosa procedencia se caracterizan por una formulación incorrecta y poca durabilidad. En casos extremos, estos productos pueden agravar las condiciones de tratamiento debido al contenido de ingredientes dañinos e incluso pueden ocasionar riesgos graves para la salud o la vida.

Como resultado de los efectos desfavorables de los medicamentos falsificados, la confianza pública en los sistemas de salud, los trabajadores de la salud, la industria farmacéutica y las agencias de seguridad nacional está expuesta (WHO, 1999).

El Laboratorio del Departamento de Bioanálisis y Análisis de Drogas, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Médica de Varsovia, brinda el estudio de diferentes análisis de drogas que son cautivadas por la policía de Poznan y Varsovia, de las cuales se obtienen estudios analíticos para poder resolver la duda de la procedencia

de esos medicamentos, por el alto índice de tráfico de medicamentos adulterados que existe en Polonia y el mundo entero.

3. Problema:

¿Se podrán determinar los inhibidores de PDE-5 en medicamentos falsificados mediante la espectroscopia Raman y Espectrometría de masas?

1. MARCO REFERENCIAL:

4.1 Fragmentación de los inhibidores PDE-5:

4.1.1 Inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5

La fosfodiesterasa (PDE, fosfodiesterasa) es una enzima que hidroliza e inactiva los nucleótidos cíclicos de cAMP y cGMP. Estos nucleótidos son transductores de señal secundarios en la célula, participan en procesos tales como: contractilidad cardíaca, agregación plaquetaria, lipólisis, glucogenólisis y contracción del músculo liso, y cumplen muchas funciones reguladoras importantes en el cuerpo. Hay varios tipos de fosfodiesterasa con cinética separada, afinidad de sustrato y propiedades farmacológicas que se han clasificado en 11 familias (PDE-1 - PDE-11). Isoenzimas PDE-4, PDE-7 y PDE-8 son selectivos para el cAMP al degradarlo a monofosfato de 5'-adenosina (AMP), mientras que PDE-5, PDE-6 y PDE-9 hidrolizan cGMP a monofosfato de 5'-guanosina (GMP). Otros tipos de enzimas (PDE-1, PDE-2, PDE-3, PDE-10, PDE-11) inactivan el AMPc y cGMP. La fosfodiesterasa tipo 5 se encuentra en las células musculares lisas de los cuerpos cavernosos del pene, los vasos y los bronquios, lo que la hace de mayor importancia funcional y por ende en los fármacos utilizados para la disfunción eréctil.

Los inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5 (inhibidores de la PDE-5, inhibidores de la fosfodiesterasa tipo 5) son el grupo de fármacos más comúnmente utilizado en personas que sufren disfunción eréctil. Al bloquear la enzima PDE-5, se produce la inhibición de la distribución cíclica de GMP y su acumulación y, por lo tanto, la intensificación del efecto relajante del óxido nítrico, el mantenimiento del músculo liso del pene en la diástole y la erección.

Estos inhibidores fortalecen la cascada de señalización dependiente de NO / cGMP, por lo tanto, para su correcto funcionamiento, es necesario compartir el óxido nítrico, que estimula la producción de cGMP. Los agentes curativos de este grupo no causan una erección en ausencia de estimulación sexual.

La primera sustancia con este efecto fue el sildenafil descubierto en 1989 y patentado por Pfizer en 1993. Un fármaco oral pionero que contiene sildenafil (Viagra) fue aprobado por la FDA en 1998. Inicialmente, el sildenafil se estudió como un agente hipotensor y analgésico debido a las propiedades vasodilatadoras, sin embargo, no hubo eficacia clínica en estas indicaciones. Hubo un efecto

secundario frecuente en la forma de erecciones, lo que llevó a la empresa a esforzarse por registrar el medicamento con una indicación de disfunción eréctil. En 2003, la FDA aprobó la comercialización de otros dos inhibidores de la PDE-5: Levitra (que contiene vardenafil) y Cialis (que contiene tadalafil). La última asociación de este grupo, avanafil, fue comercializada por la FDA en 2012 bajo el nombre de Stendra (Vivus), y en 2013 por la Agencia Europea de Medicamentos con el nombre de Spedra (Grupo Menarini).

Tabla 1. Características de los medicamentos autorizados para la comercialización utilizados para la disfunción eréctil, los inhibidores de la PDE-5.

Nº	Nombre	Principio activo	Fecha de ingreso al mercado	Fabricante	Forma farmaceutica	Dosis [mg]
1.	Viagra	sildenafil	14.09.1998	Pfizer	Comprimidos recubiertos	25, 50, 100
					comprimidos bucodispersables	50
2.	Cialis	tadalafil	12.11.2002	Eli Lilly	Comprimidos recubiertos	2.5, 5, 10, 20
					Comprimidos recubiertos	5, 10, 20
3.	Vianza	vardenafil	04.03.2003	Bayer	Comprimidos bucodispersables	10
4.	Levitra	vardenafil	06.03.2003	Bayer	Comprimidos recubiertos	5, 10, 20
					Comprimidos bucodispersables	10
5.	Vizarsin	sildenafil	21.09.2009	KRKA	Comprimidos recubiertos	25, 50, 100
					Comprimidos bucodispersables	25, 50, 100
6.	Sildenafil Teva	sildenafil	30.11.2009	Teva	Comprimidos recubiertos	25, 50, 100
7.	Sildenafil Actavis	sildenafil	10.12.2009	Actavis	Comprimidos recubiertos	25, 50, 100
8.	Sildenafil ratiopharm	sildenafil	23.12.2009	Ratiopharm	Comprimidos recubiertos	25, 50, 100
9.	Spedra	awanafil	21.06.2013	Menarini Group	Comprimido	50, 100, 200
10.	Tadalafil Mylan	tadalafil	21.11.2014	Mylan	Comprimido	2.5, 5, 10, 20

11.	Tadalafil Lilly	tadalafil	22.03.2017	Eli Lilly	Comprimidos recubiertos	2.5, 5, 10, 20
-----	----------------------------	-----------	------------	-----------	----------------------------	----------------

Fuente: OMS.

4.1.2 Fragmentación

El primer paso en la identificación de los inhibidores de la PDE-5 es la identificación de los iones pseudomoleculares, que surgen como resultado de la protonación o desprotonación de la molécula.

Tabla 2. Pesos de inhibidores de PDE-5 seleccionados formados como resultado de la protonación y desprotonación de la molécula.

Nombre	Patrón total	Masa	[M+H] ⁺	[M+H] ⁻
SILDENAFIL	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	474,20492	475,21	473,45
TADALAFIL	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	389,13756	390	388,1288
VARDENAFIL	C ₂₂ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	488,22057	489,2274	487,33

USP

Fuente
Europea

Al realizar el espectro de fragmentación en la espectrometría en tándem se aisló el ión precursor y luego se realizó su fragmentación. Gracias a esto, se garantizó que los fragmentos obtenidos provinieran de un ion con m / z definido.

Tabla 3. Fragmentos característicos de los inhibidores de PDE-5.

Nombre común	Patrón total	Masa	El valor m / z del ion padre [M+H] ⁺	El valor m / z del ion padre [M+H] ⁻	El valor de los iones de fragmentación m / z
SILDENAFIL	C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S	474,20492	475,21	-	447, 418, 391, 377, 374, 346, 329, 311, 297, 283, 255, 163, 160, 100
			-	473,45	445, 310, 282
TADALAFIL	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄	389,13756	390	-	302, 268, 262, 250, 240, 197, 169, 135
			-	388,1288	262, 234, 233, 232 461, 420, 377, 376,
VARDENAFIL	C ₂₂ H ₃₂ N ₆ O ₄ S	488,22057	489,2274	-	375, 346, 339, 329, 312, 299, 284, 283, 169, 151, 123, 99
			-	487,33	459, 310, 282

Fuente USP Europea .

4.2 Definición Operacional

Determinación mediante la metodología del HPLC y Truscam a través de la interpretación de los fragmentos observados:

El espectrómetro de masas en tándem está equipado con un analizador dual y un dispositivo que permite la fragmentación de iones. Después de ionizar las sustancias analizadas a presión atmosférica, los iones se transfieren a la parte del espectrómetro a alto vacío en la que se encuentran los analizadores de masas. Se utilizan para analizar / separar iones según su relación masa / carga (m/z).

TruScan proporciona los resultados basados en los algoritmos apropiados y el valor p determinado. Si la sustancia de prueba muestra en el análisis un valor p , el cumplimiento total con la sustancia de referencia ('strong pass') ("paso fuerte") se asigna a las muestras que durante el análisis mostraron un valor de p mayor o igual a 0.2. Las sustancias que tienen valores de p por debajo de 0.2 y mayores o iguales a 0.05 están determinadas por un resultado de pase débil, mientras que los valores por debajo de 0.05 y mayores o iguales a 0.01 se atribuyen a un resultado mal negativo ('weak pass') ('falla débil'). Las muestras con valores por debajo de 0.01 indican un incumplimiento total de la sustancia de referencia ('strong fail') ('falla fuerte').

Variable	Dimensiones	Indicadores	Unidad de Medida	Escala
Fragmentos (Fragmentación de los inhibidores PDE-5)	Determinación de la presencia de fragmentos	-Relación masa -carga (m/z).	-Cuantitativa	Ordinal

2. HIPÓTESIS:

Se determinó la presencia de fragmentos de los inhibidores de la PDE-5 en medicamentos para la disfunción eréctil, Universidad Médica de Varsovia, 2018.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo General:

- Determinar la presencia de fragmentos de los inhibidores de PDE-5 empleando métodos de espectroscopia y espectrometría en medicamentos adulterados, Universidad medica de Varsovia, 2018.

3.2. Objetivos Específicos:

- Obtener las muestras de medicamentos falsificados, mediante la metodología de Raman y la Espectroscopia de Masas
- Determinar las concentraciones para el procesamiento de las muestras
- Determinar la presencia de los inhibidores de PDE-5 mediante la espectroscopia Raman
- Determinar la presencia de los inhibidores de PDE-5 mediante la espectrometría de masas Agilent 1290 Infinity II

II. METODOLOGÍA

2.1 Tipo y diseño de la investigación

La investigación es descriptiva, cuantitativa.

2.2 Población y Muestra

Nr.	Nombre	Sustancia Activa declarada	Dosis declarada [mg]	Número de evidencia
1				001/16/01
2				001/16/02
3				001/16/05
4				001/16/07
5				001/16/08
6				001/16/09
7				002/16/01
8				002/16/02
9				002/16/03
10				002/16/04
11				002/16/05
12				002/16/07
13	Viagra	sildenafil	100	003/16/04/A
14				003/16/04/B
15				003/16/04/A/1
16				006/17/02
17				006/17/03
18				006/17/12/1
19				007/17/04
20				007/17/05
21				019/18/14
22				019/18/45
23				019/18/46
24				008/17/01/01
25				008/17/03/02
26				008/17/04
27				001/16/03
28				001/16/06
29	Cialis	tadalafil	20	003/16/10/A
30				019/18/25
31				019/18/73

32				019/18/76
33				006/17/15/1
34				006/17/18
35				006/17/19
36				007/17/01
37				007/17/07/06
38				007/17/09/02
39				012/17/03
39				017/18/02
40				019/18/74
41	Silver	sildenafil	100	019/18/17
42				007/17/08/2
43				007/17/07/3
44	Sextreme	sildenafil	200	019/18/72
45	Kamagra	sildenafil	100	019/18/13
46				007/17/07/16
47	Tadalafil	tadalafil	20	019/18/77
48	Tadaver	tadalafil	20	019/18/15
49	Vikalis	tadalafil	20	019/18/75
50	Super Valtera	varденаfil	20	019/18/79
51		sildenafil	100	007/17/09/1
52		sildenafil	100	012/17/05
53		sildenafil	100	012/17/04
54		sildenafil	100	009/17/22

PROCEDIMIENTO

2.1 Técnicas e instrumentos de investigación

Técnica

- Espectrofotometría de masas
- Espectroscopia Raman

Instrumentos:

- HLPC-MS Agilent 1290 Infinity II
- Analizador manual TruScan

2.2 Obención de la muestra de Inhibidores de PDE5

La muestra fue adquirida gracias al trabajo en colaboración con la Policía de la ciudad de Poznan y la Policía de la ciudad de Varsovia en el país de Polonia.

De cada lote de medicamentos de dudosa procedencia que ellos incauten, fueron elegidos al azar una a dos cajas que contenían aproximadamente mil tabletas, las cuales fueron llevadas para ser analizadas en el Departamento de Bioanálisis y Análisis de drogas de la Universidad Médica de Varsovia.

Se verificaron los números de serie y las fechas de vencimiento de los medicamentos. Registramos nuestras muestras habiendo tenido en cuenta datos sobre la fecha de recepción, código de pedido y códigos de muestra, nombres de productos, dosis, formularios farmacéuticos, fechas de caducidad, números de lote, número de paquetes y el cliente. Además, el ancho, la longitud y la altura de las tabletas se midieron usando una regla digital. Las tabletas también se pesaron en la balanza analítica.

2.3 Metodología para la determinación de PDE-5 usando el Analizador manual TrusCan RM

Se determinó la presencia de inhibidores de PDE-5 con el analizador TruScan el cual usa espectrometría Raman, un tipo de espectroscopia vibracional que caracteriza los materiales basados en patrones medidos de frecuencias vibratorias o longitudes de onda. El analizador emite una luz láser a 785 nm y detecta fotones dispersos en otras longitudes de onda. La luz dispersada es una huella digital única para ese material, y el analizador TruScan RM usó esta "huella digital espectral" para identificar la materia prima o los productos farmacéuticos terminados. La longitud de onda del láser de 785 nm proporciona un equilibrio óptimo para medir la mayoría de los materiales farmacéuticos sin comprometer la resolución espectral o la intensidad de la señal Raman (ThermoFisher, 2016).

Por medio del analizador TruScan RM se adquirió el espectro Raman de los medicamentos proporcionados por la Policía de Poznan y Varsovia, en tiempo real, determinando la seguridad de esa medición, dados factores como las características de la muestra, la telemetría del instrumento y el entorno de prueba. Dado que el

software modela la seguridad (o en términos estadísticos, desviación estándar) directamente.

Para investigar la evidencia utilizando el espectrómetro móvil Ramana - TruScan RM, fué necesario crear en el dispositivo métodos adecuados basados en los espectros Raman de los productos de referencia originales. Los siguientes métodos fueron guardados en la biblioteca TruScan:

- Espectro recogido de la superficie de la tableta original de Viagra 100 mg, Pfizer (espectros recogidos de la superficie de 4 comprimidos)
- Espectro recogido de la tableta original Viagra 100 mg en polvo, Pfizer (espectros recogidos de 2 comprimidos en polvo)
- Espectro recogido del núcleo de bisección de la tableta original de Viagra 100 mg, Pfizer
(Se recogieron los espectros de los núcleos de 3 comprimidos).
- Espectro recogido de la superficie de la tableta original de Cialis 20 mg, Eli Lilly (el espectro fue recogido de la superficie de 1 tableta)
- Espectro recogido de la superficie de la tableta original de Levitra 20 mg, Bayer (el espectro fue recogido de la superficie de 1 tableta)

Después de la validación de cada método, la evidencia fué escaneada.

Las muestras apropiadas de Viagra 100 mg, Se seleccionaron al azar de una a tres tabletas, dependiendo de la cantidad de material que se escanearon utilizando el método de la superficie de la tableta. Una o tres tabletas se dividieron en dos y se escanearon utilizando el método central. Las tabletas etiquetadas como Viagra 100 mg numeradas 001/16 – 019/18 se analizaron por la superficie de la tableta y desde una tableta en polvo. La evidencia de Viagra 100 mg numerada 002/16 se examinó mediante los siguientes métodos: desde la superficie, desde el núcleo y desde la tableta en polvo. Las muestras de Viagra 100 mg marcadas con los números 006/17 se escanearon utilizando la superficie de la tableta y los métodos centrales (Tabla 4).

Tabla 4. La cantidad de tabletas tomadas para las pruebas declaradas como Viagra y el método de sus pruebas con TruScan.

Nr.	Número de la muestra	Número de tabletas probadas	Método de prueba TruScan		
			Espectros desde la superficie de las tabletas.	Espectros de núcleos de tabletas.	Espectro de una tableta en polvo.
1.	001/16/01	3	+	-	-
		1	-	-	+
2.	001/16/02	3	+	-	-
		1	-	-	+
3.	001/16/05	3	+	-	-
		1	-	-	+
4.	001/16/07	3	+	-	-
		1	-	-	+
5.	001/16/08	3	+	-	-
		1	-	-	+
6.	001/16/09	3	+	-	-
		1	-	-	+
7.	002/16/01	3	+	-	-
		3	-	+	-
8.	002/16/02	1	+	-	-
		1	+	-	-
9.	006/17/03	2	+	-	-
		1	+	-	-
10.	002/16/03	3	+	-	-
		3	-	+	-
11.	002/16/04	1	-	-	+
		3	+	-	-
12.	002/16/05	3	-	+	-
		1	-	-	+
13.	002/16/07	3	+	-	-
14.	003/16/04/A	3	+	-	-
15.	003/16/04/B	2	+	-	-
		1	-	+	-
16.	003/16/04/A/1	2	+	-	-
		1	-	+	-
17.	006/17/02	2	+	-	-
		1	-	+	-
18.	006/17/03	3	+	-	-
19.	006/17/12/1	3	+	-	-
20.	007/17/04	3	+	-	-
21.	007/17/05	3	+	-	-
22.	019/18/14	1	+	-	-
23.	019/18/45	1	+	-	-
24.	019/18/46	3	+	-	-
25.	008/17/01/01	3	+	-	-

2.4 Metodología para la determinación de PDE-5 usando HPLC-MS Agilent 1290 Infinity II

2.4.1 Determinación de los parámetros de los medicamentos

Se determinó el promedio de las mediciones de masa y las dimensiones de nuestra muestra, teniendo en cuenta la disponibilidad de tabletas originales que sirvieron como material comparativo.

Las dimensiones físicas del material junto con la densidad de los materiales en la formulación de las tabletas determinaron su peso. Las dimensiones (diámetro y altura) fueron medidas con una regla digital. Las medidas tuvieron máximo una variación del 5% del valor estandarizado (material comparativo).

2.4.2 Preparado de la muestra para HPLC-MS Agilent 1290 Infinity II

Después de que seleccionamos las muestras de ensayo adecuadas para un espectrómetro de masas (algunos comprimidos de la serie) se procedió a su homogenización inicial (trituyendo las tabletas en un mortero).

Después de que habíamos seleccionado las muestras apropiadas para el espectrómetro de masas (varias tabletas de una serie dada), pre-homogenizamos (trituyamos las tabletas en un mortero). Luego sometimos las muestras a extracción sólido-líquido con ultrasonido. El sildenafil, el vardenafil y sus derivados, que generalmente se encuentran en los productos de sal, se disuelven bien en mezclas de agua orgánica, por lo tanto, se utilizó una solución de una mezcla de tres solventes para extraerlos: acetonitrilo: metanol: agua (1: 1: 1, v / v / v). Por el contrario, el tadalafil solo es soluble en acetonitrilo y sus mezclas con agua, por lo que en este caso se utilizó una solución de una mezcla de dos disolventes: acetonitrilo: agua (2: 1, v / v).

Después que realizamos la extracción, procedimos a centrifugar las muestras y filtramos. Finalmente, la muestra que preparamos fué sometida a investigación cuantitativa.

2.5 Procesamiento y análisis de la información

Para procesamiento de los resultados obtenidos en este estudio, se empleó un análisis instrumental, a través de equipos como el espectrofotómetro de masas en tándem y el analizador manual TruScan en los cuales se obtuvo los datos de los fragmentos en los inhibidores de la PDE-5 tales como el Sildenafil, Tadalafil y Vardenafil, siendo los valores $p \geq 0.2$ ('strong pass') valores de $p \geq 0.05$ ('weak pass') ≤ 0.01 ('strong fail').

Para el análisis se utilizó el Software Compound *Discoverer* y la información se presentó en tablas y gráficos.

III. RESULTADOS

a. Determinación de los parámetros de los medicamentos (Peso y Longitud)

La Tabla 5 (Viagra) y 6 (Cialis) muestran los resultados promedio de las mediciones de masa y las dimensiones de la tableta. Las tabletas de Viagra y Cialis con los números de lote 001/16, 002/16, 003/16, 019/18 se pesaron y se midieron, ya que el material comparativo en la forma de las tabletas originales de Viagra y Cialis estaba disponible. Los parámetros de las tabletas de referencia se dan en la Tabla 12.

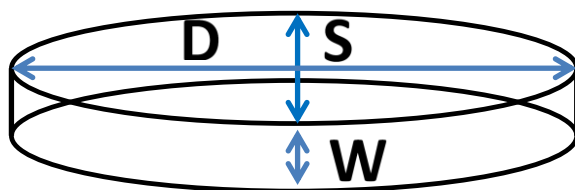


Figura 1. La forma de dimensionar tabletas.

Tabla 5. Parámetros de evidencia material declarados como Viagra

Nr.	Número de prueba	Promedio de masa [mg]	Longitud (L) x Anchura (A) x Altura (A) [mm]
1.	001/16/01	599,1 ± 27,8	14,68±0,05 x 10,51±0,02 x 5,71±0,03
2.	001/16/02	619,2 ± 8,7	14,61±0,03 x 10,50±0,01 x 5,60±0,05
3.	001/16/05	571,7 ± 16,3	14,73±0,02 x 10,59±0,02 x 5,43±0,09
4.	001/16/07	584,8 ± 28,4	14,67±0,03 x 10,53±0,02 x 5,67±0,10
5.	001/16/08	617,5 ± 17,2	14,66±0,02 x 10,53±0,02 x 5,61±0,09
6.	001/16/09	601,2 ± 19,0	14,67±0,04 x 10,53±0,04 x 5,66±0,08

7.	002/16/01	599,2 ± 3,3	14,39±0,03 x 10,36± 0,03 x 5,75±0,04
8.	002/16/02	594,4 ± 6,7	14,37±0,01 x 10,35±0,01 x 5,74±0,02
9.	002/16/03	689 ± 11	14,66±0,05 x 10,63±0,05 x 5,95±0,06
10.	002/16/04	604,8 ± 4,1	14,38±0,01 x 10,35±0,01 x 5,75±0,03
11.	002/16/05	597,3 ± 8,1	14,38±0,04 x 10,32±0,03 x 5,74±0,07
12.	002/16/07	595,7 ± 7,3	14,37±0,03 x 10,34±0,03 x 5,72±0,04
13.	003/16/04/A	654,5 ± 19,3	14,71±0,04 x 10,65± 0,05 x 5,69±0,11
14.	003/16/04/B	584,2 ± 44,3	14,87±0,18 x 10,75± 0,12 x 5,58±0,24

Tabla 6. Parámetros de evidencia material declarados como Cialis.

Nr.	Número de prueba	Promedio de masa [mg]	Longitud (L) x Anchura (A) x Altura (A) [mm]
1.	001/16/03	454,3 ± 6,6	12,98±0,02 x 7,93±0,01 x 6,04±0,05
2.	001/16/06	428,6 ± 10,2	12,54±0,02 x 7,64±0,01 x 5,92±0,06
3.	003/16/10/A	398,8 ± 15,9	12,67±0,04 x 7,74± 0,04 x 5,43±0,20
4.	019/18/25	385,8 ± 4,8	12,37±0,01 x 7,57± 0,01 x 5,13±0,01
5.	019/18/73	409,6 ± 2,9	12,70±0,01 x 7,80± 0,01 x 5,50±0,01
6.	019/18/76	413,1 ± 9,1	12,68±0,06 x 7,76± 0,01 x 5,50±0,07

Tabla 7. Parámetros de las tabletas originales de Viagra 100 mg y Cialis 20 mg.

Nr.	Nombre	Promedio de masa [mg]	Longitud (L) x Ancho (A) x Altura (A) [mm]
1.	Viagra 100 mg	618,9 ± 3,7	14,29±0,01 x 10,42±0,01 x 5,35±0,01
2.	Cialis 20 mg	357,1 ± 0,7	12,25±0,01 x 7,52± 0,01 x 4,92±0,01

Las siguientes tablas presentan los resultados promedio de las pruebas llevadas a cabo con el espectrómetro móvil TruScan RM y el espectrómetro de masas Agilent 1290 Infinity II LC para series individuales de los productos probados. Los resultados se dividen en tablas para: tabletas declarados como Viagra (Tabla 8), tabletas declaradas como Cialis (Tabla 9), tabletas declaradas como Silver (Tabla 10), tabletas declaradas como Kamagra (Tabla 11), tabletas declaradas como Sextreme (Tabla 12), tabletas declaradas como Tadalafil (Tabla 13), tabletas declaradas como Tadaver (Tabla 14), tabletas declaradas como Vikalis (Tabla 15) tabletas declaradas como Super Valtera (Tabla 16) medicamentos de origen desconocido que contienen tabletas de sildenafil según la marca (Tabla 17).

Tabla 8. Resultados de las pruebas llevadas a cabo con el espectrómetro móvil TruScan RM y el espectrómetro de masas Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Viagra.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	001/16/01	Espectro de la superficie de la tableta original de viagra Espectros de las tabletas originales de Viagra en polvo	Superficie de 3 tabletas 1 tableta en polvo	-	-	0,0043	-	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
2.	001/16/02	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra. Espectros de las tabletas originales de Viagra en polvo	Superficie de 3 tabletas 1 tableta en polvo	-	-	0,0122	-	Se detectó y confirmó la identidad de: sildenafil
3.	001/16/05	Espectros de las tabletas	Superficie de 3 tabletas	-	-	0,0154	-	

4.	001/16/07	originales de Viagra en polvo	1 tableta en polvo	-	-	0,0054	-	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
		Espectros de las tabletas	Superficie de 3 tabletas	-	-	0,0054	-	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
		originales de Viagra en polvo	1 tableta en polvo	-	-	-	0,0009	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
		Espectros de las tabletas	Superficie de 3 tabletas	-	-	0,0183	-	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
5.	001/16/08	originales de Viagra en polvo	1 tableta en polvo	-	-	0,0033	-	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
		Espectros de las tabletas	Superficie de 3 tabletas	-	-	0,0105	-	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
		originales de Viagra en polvo	1 tableta en polvo	-	-	-	0,0009	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
		Espectros de las tabletas	Superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0003	presencia e identidad confirmada de: sildenafil y tadalafil.
6.	001/16/09	originales de Viagra en polvo	Núcleo de 3 tabletas	-	0,1227	-	-	Se detectó y confirmó la identidad de: sildenafil
		Espectros de las tabletas	1 tableta en polvo	-	0,0711	-	-	
		originales de Viagra en polvo	Superficie de 1 tableta	-	-	-	0,0003	presencia e identidad confirmada: sildenafil
		Espectros de las tabletas	Superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada: sildenafil
7.	002/16/01	originales de Viagra en polvo	Superficie de 1 tableta	-	-	-	0,0005	Presencia y identidad confirmada de sildenafil.
		Espectros de las tabletas	Superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0005	Presencia y identidad confirmada de sildenafil.
		originales de Viagra en polvo						
		Espectros de la superficie de las tabletas						
8.	002/16/02	originales de Viagra en polvo						
		Espectros de las tabletas						
		originales de Viagra en polvo						
		Espectros de las tabletas						
9.	002/16/03	originales de Viagra en polvo						
		Espectros de las tabletas						
		originales de Viagra en polvo						
		Espectros de las tabletas						
10.	002/16/04	originales de Viagra en polvo						
		Espectros de la superficie de las tabletas						
		originales de Viagra en polvo						
		Espectros de las tabletas						
11.	002/16/05	originales de Viagra en polvo						
		Espectros de las tabletas						
		originales de Viagra en polvo						
		Espectros de las tabletas						

		Espectros de los núcleos de las tabletas originales de Viagra.	Núcleo de 3 tabletas	-	0,1254	-	-	
		Espectros de las tabletas originales de Viagra en polvo	1 tableta en polvo	-	0,0841	-	-	
		Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	Superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0004	
12.	002/16/07	Espectros de los núcleos de las tabletas originales de Viagra.	Núcleo de 3 tabletas	-	0,1391	-	-	Presencia y identidad confirmada de sildenafil.
		Espectro de las tabletas originales de Viagra en polvo.	1 tableta en polvo	-	-	0,0451	-	
13.	003/16/04/A	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	Superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil
14.	003/16/04/B	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil
		Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	superficie de 2 tabletas	-	-	0,0016	-	
15.	006/17/02	Espectros de los núcleos de las tabletas originales de Viagra.	Núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
		Espectros de las superficies originales - Viagra tabletas.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	
16.	006/17/03	Espectros de los núcleos de las tabletas originales de Viagra.	Núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
		Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra	Superficie de 2 tabletas	-	-	0,0020	-	
17.	006/17/12/1	Espectros de los núcleos de las tabletas	Núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000	No datos disponibles

18.	007/17/04	originales de Viagra Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 3 tabletas	-	0,1268	-	-	No datos disponibles
19.	007/17/05	originales de Viagra Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 3 tabletas	-	-	0,0397	-	No datos disponibles
20.	008/17/01/01	originales de Viagra. Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 3 tabletas	-	-	0,0050	-	No datos disponibles
21.	008/17/01/02	originales de Viagra. Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
22.	019/18/14	originales de Viagra. Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
23.	019/18/45	originales de Viagra. Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
24.	019/18/46	originales de Viagra Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 3 tabletas	-	-	0,0056	-	No datos disponibles
25.	008/17/04	originales de Viagra Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 3 tabletas	-	-	0,0047	-	No datos disponibles

Tabla 9. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Cialis.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	001/16/03	Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil,

		originales de Cialis						no se encontró tadalafil.
2.	001/16/06	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil no se encontró tadalafil.
3.	003/16/10/A	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis	superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	Presencia y confirmada identidad del sildenafil.
			núcleo de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	no se encontró tadalafil.
			1 tableta en polvo.	-	-	-	0,0000	
4.	019/18/25	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0004	Presencia y confirmación de identidad de tadalafil.
5.	019/18/73	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	Presencia y confirmada identidad del sildenafil. no se encontró tadalafil.
6.	019/18/76	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	Presencia y confirmada identidad del sildenafil. no se encontró tadalafil.
7.	006/17/15/1	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
			núcleo de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	
8.	006/17/18	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
			núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000	
9.	006/17/19	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
			núcleo de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	
10.	007/17/01	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
11.	007/17/07/06	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0001	No datos disponibles
12.	007/17/09/02	Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles

		originales de Cialis.						
13.	012/17/03	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0001	No datos disponibles
14.	017/18/03	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Cialis	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles

Tabla 10. Resultados de pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - TruScan'rm RM para muestras declaradas como Silver.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	019/18/74	Espectros de la superficie de las tabletas de Silver originales.	superficie de 1 tableta. Núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000 0,0000	No datos disponibles
2.	019/18/17	Espectros de la superficie de las tabletas de Silver originales.	1 tableta en polvo	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
3.	007/17/08/2	Espectros de la superficie de las tabletas de Silver originales.	1 tableta en polvo	-	-	-	0,0001	No datos disponibles

Tabla 11. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Kamagra.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	019/18/13	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra	Superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil.
2.	007/17/07/16	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	Superficie de 3 tabletas	-	-	-	0,0000	Presencia e identidad confirmada: sildenafil y tadalafil.

Tabla 12. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Sextreme.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	019/18/13	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	Superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil.
			Núcleo de 1 tableta	0,4114	-	-	-	

Tabla 13. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Tadalís.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	019/18/77	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Tadalís.	Superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	Presencia y confirmación de identidad de tadalafil.
			Núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000	

Tabla 14. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Tadaver.

Lp.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	019/18/15	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Tadaver.	superficie de 1 tableta	-	-	-	0,0000	Presencia y confirmación de identidad de tadalafil.
			núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000	

Tabla 15. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Vikalis.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	019/18/75	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Vikalis.	Superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	No datos disponibles
			núcleo de 1 tableta	-	-	-	0,0000	

Tabla 16. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Super Valtera.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	019/18/79	spectros de la superficie de las tabletas originales Super Valtera.	superficie de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	Presencia y confirmación de identidad de vardenafil.
			núcleo de 1 tableta.	-	-	-	0,0000	

Tabla 17. Resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras de origen desconocido.

Nr.	Número asignado a la serie	Método utilizado en el estudio TruScan	Método para recoger espectro de muestras	Valor <i>p</i> medio en el estudio TruScan				Resultado de la espectrometría de masas
				Strong pass	Weak pass	Weak fail	Strong fail	
1.	007/17/09/1	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil
			núcleo de 1 tableta	0,3253	-	-	-	
2.	012/17/05	Espectros de la superficie de las tabletas	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil
			núcleo de 1 tableta	0,4155	-	-	-	

		originales de Viagra.						
3.	012/17/04	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil
			núcleo de 1 tableta	0,2183	-	-	-	
4.	009/17/22	Espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra.	superficie de 2 tabletas	-	-	-	0,0000	presencia e identidad confirmada sildenafil

A continuación, se presentan los informes de la investigación con TruScan' RM (Figura 2-5) y espectros de espectrometría de masas (Figura 6-8).

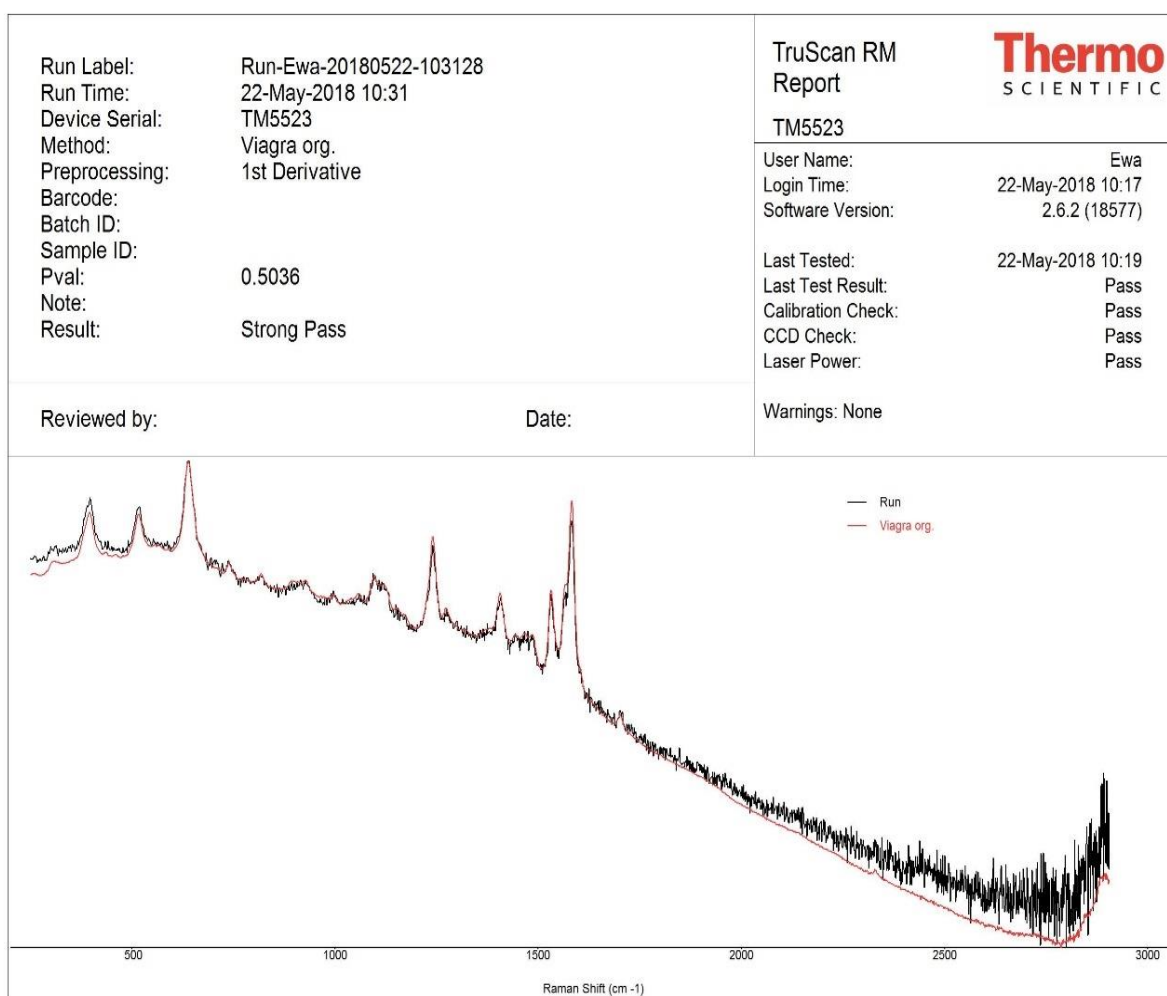


Figura 2. Informe de prueba de TruScan del número de muestra 019/18/13 (Kamagra) basado en espectros de la superficie de las tabletas originales de Viagra. El espectro se recogió de una tableta en polvo; resultado 'Strong Pass'

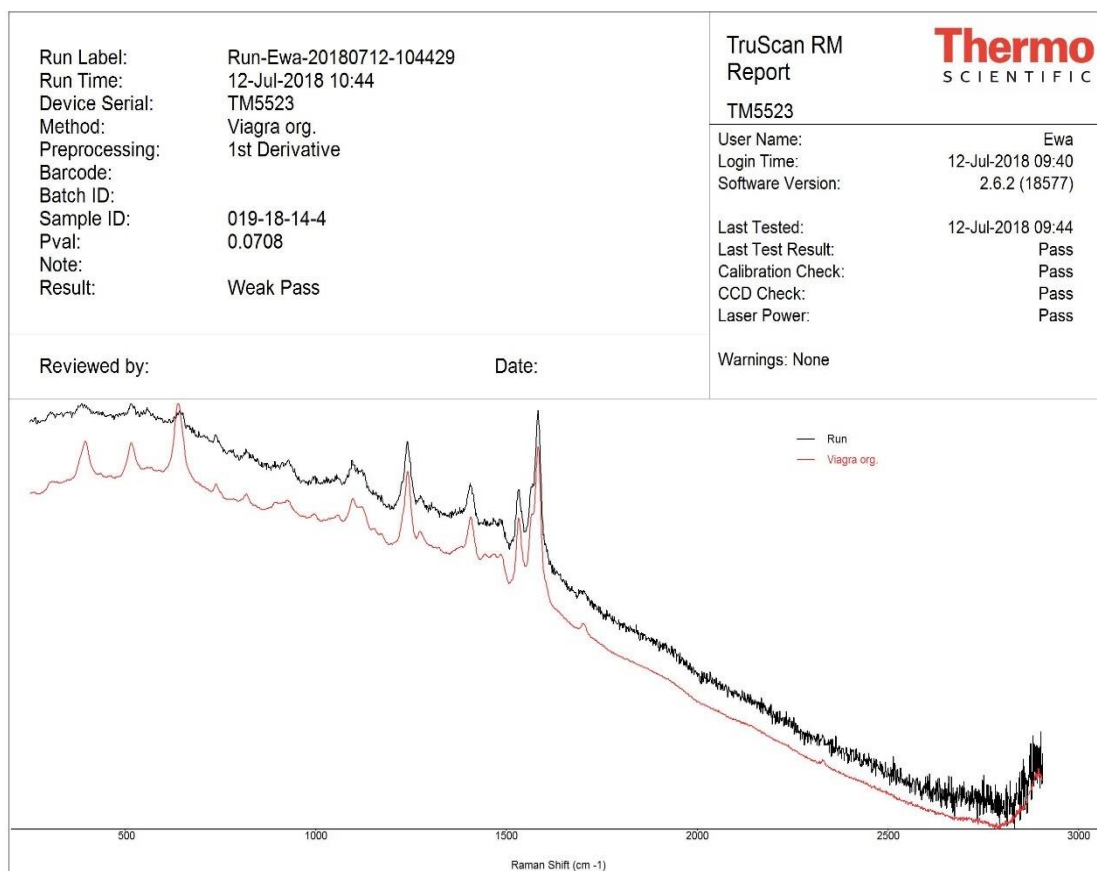


Figura 3. Informe de prueba TruScan del número de muestra 019/18/14 (Viagra) basado en los espectros del núcleo de las tabletas originales de Viagra. El espectro se recogió del núcleo de la tableta; el resultado 'Weak Pass'

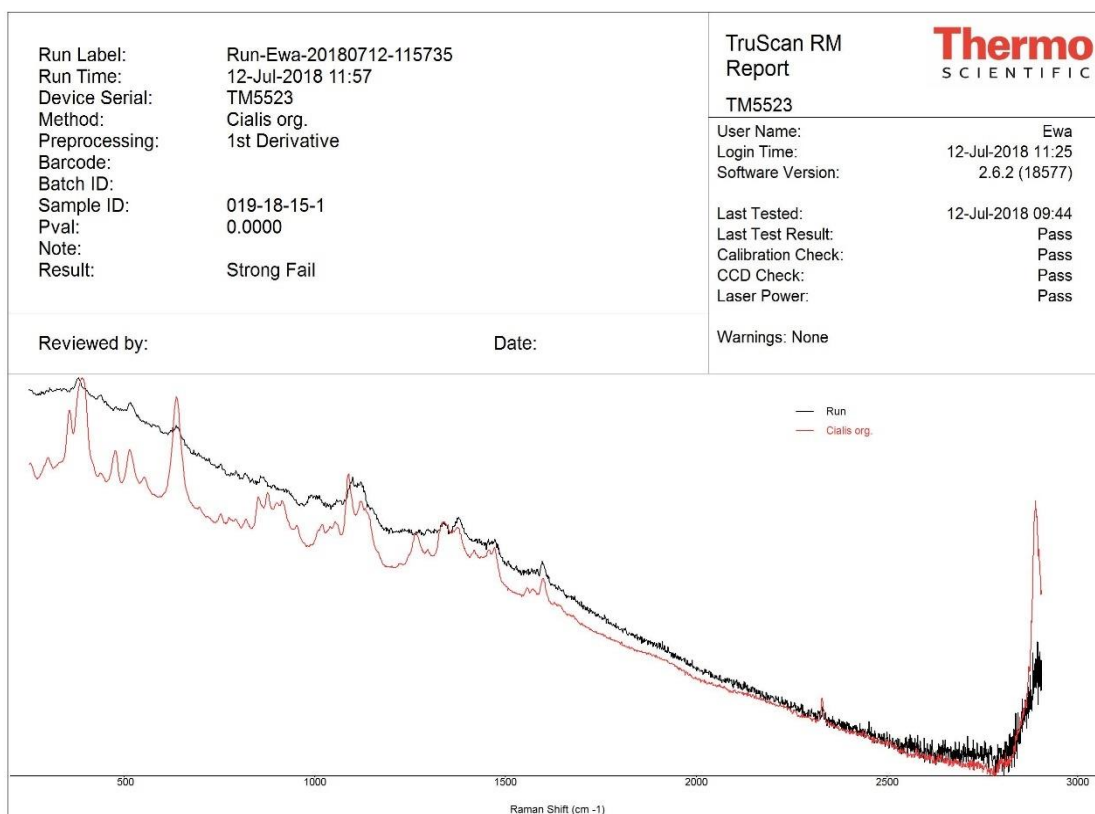


Figura 4. Informe de prueba TruScan del número de muestra 019/18/15 (Cialis) basado en los espectros del núcleo de las tabletas originales de Cialis. El espectro se recogió del núcleo de la tableta; el resultado “Strong Fail”.

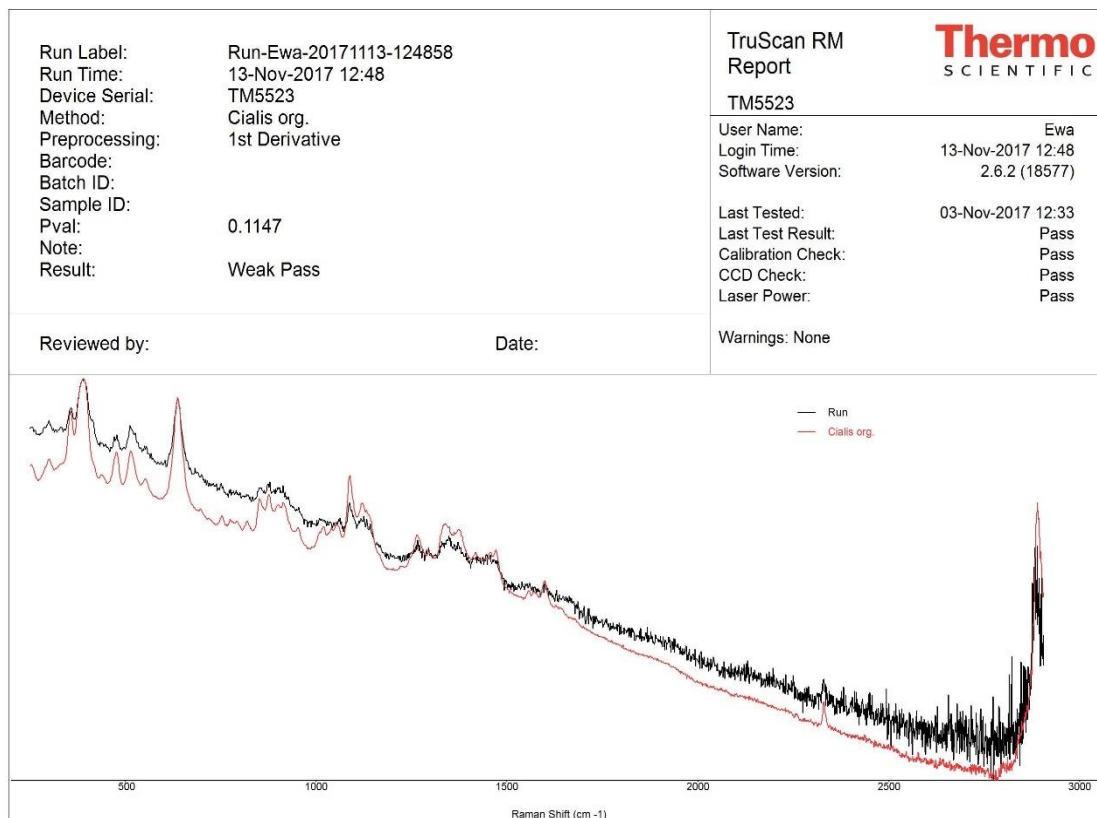


Figura 5. El informe de la encuesta TruScan'em RM de la muestra No. 001/16/06(Cialis), basado en el espectro de la superficie original de la pastilla Cialis. El espectro recogido de la superficie de la tableta; resultado “Weak Pass”.

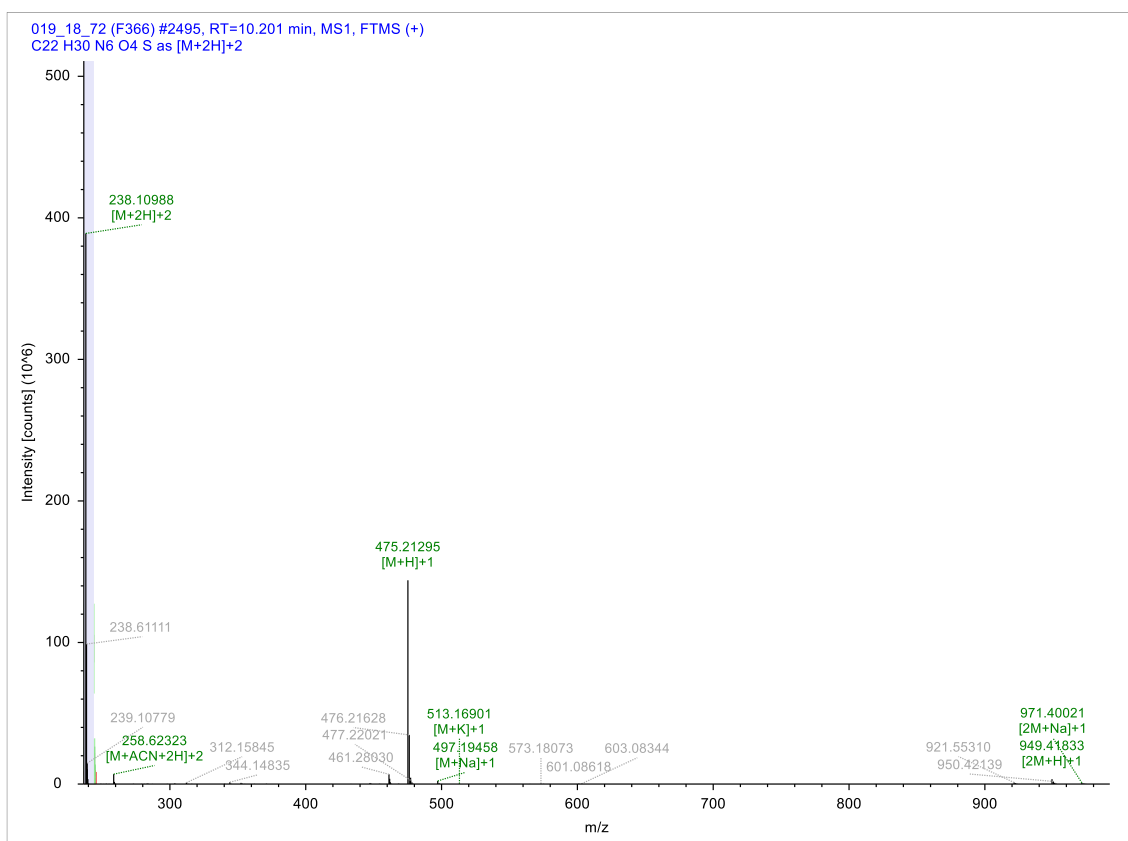


Figura 6. El espectro de masas de la tableta original de Viagra (Plomo) aplicada al espectro de masas de la muestra 019/18/72 declarada como Viagra (Verde).

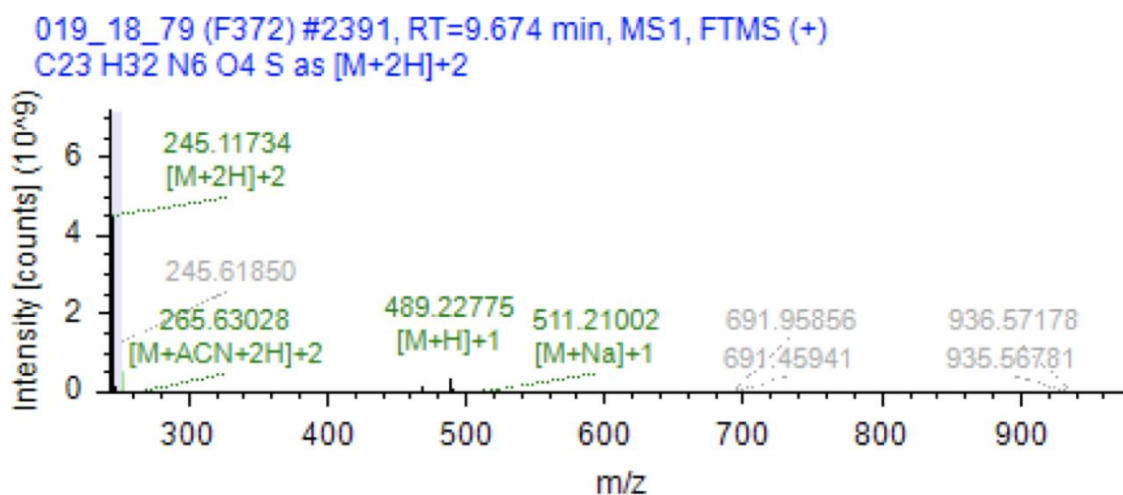


Figura 7. El espectro de masas de la tableta original de Vardenafil (Plomo) aplicada al espectro de masas de la muestra 019/18/79 declarada como Vardenafil (Verde).

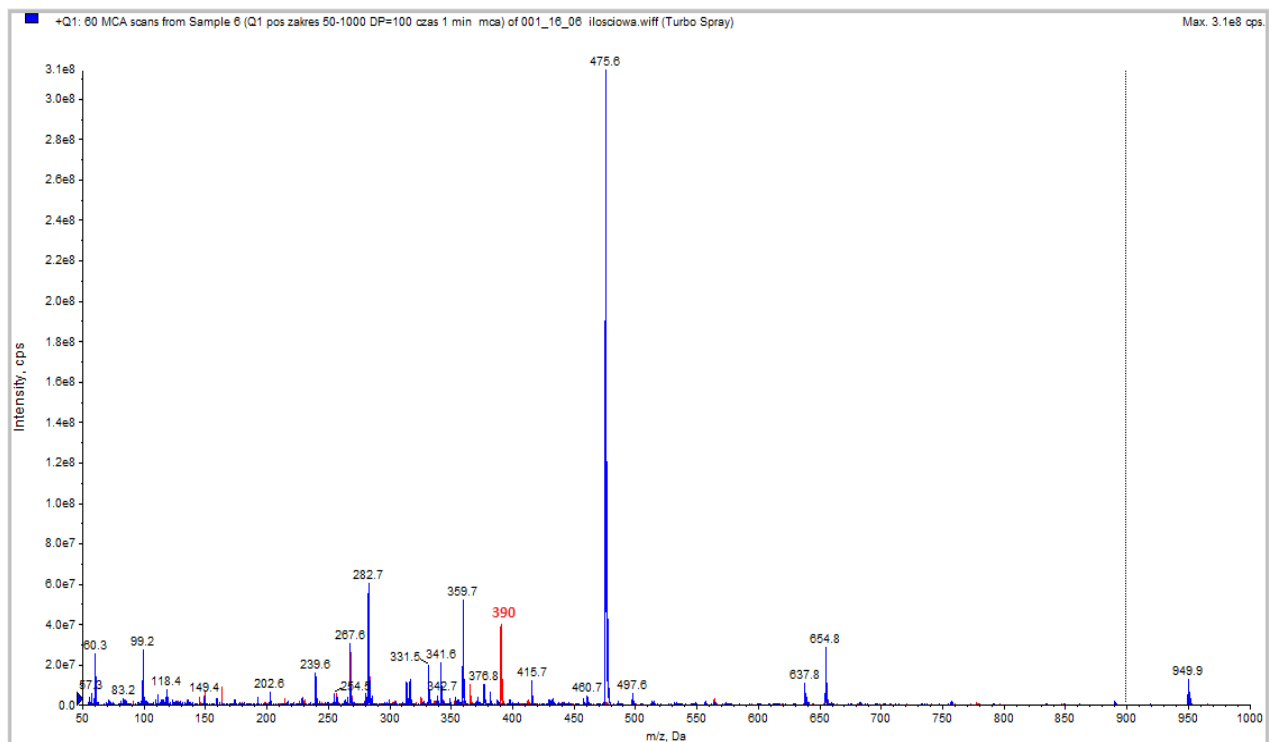


Figura 8. El espectro de masas de la tableta original de Cialis (rojo) aplicada al espectro de masas de la muestra 001/16/06 declarada como Cialis (azul).

IV. ANALISIS Y DISCUSIÓN

Después de haber realizado un exhaustivo análisis de los resultados del presente estudio se llegó a constatar que con el método de espectrometría se determinó la presencia de fragmentos de los inhibidores de la PDE-5 en medicamentos para la disfunción eréctil, Universidad Médica de Varsovia, 2018.

La mayoría de las tabletas con contenido declarado de sildenafil mostraron diferencias de peso en comparación con las tabletas de Viagra originales. Todos los materiales probados fueron significativamente más gruesos que las tabletas de referencia. Además, los productos declarados como Cialis se caracterizaron por longitudes y anchuras más largas que los productos originales, mientras que las tabletas declaradas como Viagra se caracterizaron por anchuras similares en comparación con las longitudes originales y más grandes (Tabla 8, 9).

La Tabla 8 presenta los resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Viagra. 40 resultados de ensayo obtenidos RM TruScan'em (incluyendo una variedad de maneras de recoger espectros de muestras) 0 resultados obtenidos 'pase fuerte', 6 resultados de paso débil, 15 resultados 'débiles fallan' y fallan 19 resultados fuertes". Esto significa que ninguna de las muestras analizadas fue totalmente coherente con el original, y la mayoría de ellas recibió un resultado altamente negativo. Las muestras con resultados limítrofes ('pase débil' y 'falla débil') se sometieron a pruebas adicionales. A menudo, se obtuvo un resultado diferente dentro de la misma muestra dependiendo de cómo se recolectó el espectro. Esto puede ser el resultado de la no uniformidad del contenido de la sustancia en la tableta o la diferencia en la composición de la tableta. Números evidencia 002 /16 y 003/16 caracterizados por el color azul particularmente oscuro de la cáscara que podría afectar a la permeabilidad de menos espectrómetro Raman láser. Este fenómeno se reflejó en los resultados después de recoger espectros de tabletas enteras, donde se obtuvo el incumplimiento total con el original. Un estudio de espectrometría de masas confirmó la presencia de sildenafil y tadalafil en muestras con los números: 001/16/01, 001/16/05, 001/16/07, 001/16/08, 001/16/09. Esta es una prueba de un factor de que las drogas han sido falsificadas. En las muestras restantes para las que se realizó el examen, se encontró sildenafil, sin embargo, los

resultados de otras pruebas (visual, TruScan, parámetros de tableta) también indicaron su falsificación.

La Tabla 9 presenta los resultados de las pruebas realizadas con el espectrómetro móvil Raman - espectrómetro de masas TruScan RM y Agilent 1290 Infinity II para muestras declaradas como Cialis. Todos los resultados obtenidos en el estudio TruScan mostraron un completo incumplimiento con el original ("fallo fuerte"). Además, solo una muestra (003/16/10 / A) mostró la presencia de tadalafil. Las muestras restantes examinadas con el espectrómetro de masas confirmaron la presencia e identidad tanto de tadalafil como de sildenafil. El contenido de dos sustancias activas en Cialis es inaceptable y significó claramente la falsificación del medicamento. Los resultados obtenidos del examen visual y las medidas de las tabletas también confirmaron la falsificación de la evidencia.

Los resultados obtenidos con el espectrómetro móvil Raman - TruScan RM en la mayoría de los casos mostraron la falta de conformidad de las pruebas examinadas con los productos de referencia ("falla débil" y "falla fuerte"). Ninguna de las muestras analizadas de Viagra, Cialis y Silver fue totalmente compatible con el medicamento original (no hay resultados de "pase fuerte"). Los resultados obtenidos se confirmaron mediante pruebas visuales, mediciones de los parámetros de la tableta y espectrometría de masas. Todos los productos declarados como Viagra, Cialis o Levitra fueron falsificados.

El estudio de la espectrometría de masas confirmó la presencia de sildenafil y tadalafil en los números de muestras: 001/16/01, 001/16/05, 001/16/07, 001/16/08, 001/16/09. Esta es una prueba de un factor de que las drogas han sido falsificadas. En las muestras restantes para las que se realizó el examen, se encontró sildenafil; sin embargo, los resultados de otras pruebas (visuales, TruScan, parámetros de tabletas) también indican su falsificación.

En la tabla 11, el estudio de la espectrometría de masas mostró la presencia de sildenafil y tadalafil en el número de muestra 019/18/13 y tadalafil en el número de muestra 007/17/07/16. De acuerdo con las marcas en las tabletas, estas muestras deben contener solo 100 mg y 50 mg de sildenafil, respectivamente. El estudio

confirmó la incompatibilidad de la descripción de las tabletas. En el espectrómetro de masas restante probado, se encontró sildenafil.

En la tabla 12 se muestran los picos más intensos de los espectros de Raman que provienen del principio activo, por lo que puede esperarse que estas muestras contengan sildenafil. Esto se ha confirmado en estudios de espectrometría de masas (la presencia y la identidad de sildenafil y tadalafil se confirmaron en las muestras dadas).

En la tabla 13 y 14 por medio de un estudio de la espectrometría de masas se confirmó la presencia de tadalafil en las muestras analizadas.

En la tabla 15 se observa la detección de sustancias activas en la muestra (según la biblioteca de espectro) no fue exitosa, sugiriendo la necesidad de pruebas de confirmación exhaustivas.

En la tabla 16, se observa que un estudio de la espectrometría de masas nos confirmó la presencia de Vardenafil en la muestra analizada.

Finalmente, en la tabla 17, el estudio de la espectrometría de masas nos confirmó la presencia de Sildenafil en la muestra analizada.

Por otro lado, Gratz, Flurer, y Wolnik (2004) analizaron los inhibidores de la fosfodiesterasa-5 sintéticos no declarados en suplementos dietéticos y matrices de hierbas mediante LC – ESI – MS y LC – UV. Donde encontraron que aproximadamente la mitad de los 40 productos botánicos analizados contenían inhibidores sintéticos de PDE-5 no declarados. Para los productos que contenían uno de estos tres compuestos por LC-MS, usaron HPLC con detección UV para su cuantificación.

Zhang (2010) en su investigación desarrolló un método simple y sensible para la determinación de adulterantes ilegales (yohimbina, sildenafil, vardenafil y tadalafil) en los suplementos dietéticos por HPLC-MS / MS. La separación la logró con una columna C₁₈ con la fase móvil que consistió en acetonitrilo y solución acuosa de

ácido acético al 0,1% con un gradiente de elución a un caudal de 0,5 ml / min. Los analitos fueron cuantificados e identificados mediante dos transiciones características utilizando el modo de monitoreo de reacción múltiple. Cabe recalcar que dicho método, incluyendo el número de columna y reactivos usados en la fase móvil; se han aplicado con éxito en nuestra investigación, permitiéndonos lograr la determinación de la presencia de fragmentos de los inhibidores de la PDE-5 en medicamentos para la disfunción eréctil.

Fijalek, Poplawska, Blazewicz, y Bukowska (2013) en su investigación obtuvieron resultados que indicaron que la cantidad de inhibidores de PDE-5 en todas sus muestras analizadas se consideran farmacológicamente relevante. Encontraron que el error de la determinación indirecta propuesta era de $\pm 3\%$, lo que es menos que suficiente para obtener un resultado confiable del contenido. El método que elaboraron se aplicó para análisis cuantitativos de inhibidores de PDE-5 y 10 análogos detectados en 22 suplementos dietéticos ilícitos y dos materiales herbales en polvo a granel.

Zou, Sze-Yin, Hou, Low, y Koh (2006) lograron la identificación de los inhibidores de la PDE-5 y sus análogos mediante la comparación de los tiempos de retención máximos individuales, Espectros UV y espectros de masas. Ellos encontraron que las siete muestras contenían al menos uno de los siguientes compuestos: sildenafil, vardenafil, hidroxihomosildenafil, homosildenafil y acetildenafil. Los cinco compuestos fueron determinados simultáneamente mediante LC – ESI – MS / MS en el modo de exploración de monitoreo de múltiples reacciones (MRM). El método ha sido validado por su precisión, precisión, linealidad y sensibilidad; razones por la cual decidimos usar dicho método para la determinación de la presencia de fragmentos de los inhibidores de la PDE-5.

Es preciso señalar que en las investigaciones mencionadas anteriormente no se ha usado el método de la espectroscopia Raman (TruScan). Los resultados obtenidos de los investigadores, fueron obtenidos usando el método de la cromatografía líquida de alta eficacia - MS.

El cual ha sido validado por su precisión, linealidad y sensibilidad, lo que nos da la seguridad de que del presente estudio se obtuvieron resultados confiables y muy útiles para la Policía de las ciudades de Poznan y Varsovia en el país de Polonia.

V. CONCLUSIONES

Se logró obtener las muestras de medicamentos falsificados, mediante la metodología de Raman y la Espectroscopia de Masas

Se logró determinar las concentraciones para el procesamiento de las muestras.

Se logró determinar la presencia de los inhibidores de PDE-5 mediante la espectroscopia Raman

Se logró determinar la presencia de los inhibidores de PDE-5 mediante la espectrometría de masas Agilent 1290 Infinity II

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la investigación, ya que es de suma importancia para reducir los niveles de falsificación y adulteración de medicamentos que existe en el comercio farmacéutico, ya sea de diferentes grupos terapéuticos.

El análisis farmacéutico-forense que utiliza TruScan puede ser realizado por las autoridades policiales cuando se detienen las muestras. El dispositivo es fácil de usar y el escaneo de la tableta tarda algunos o varios segundos. Debido a las limitaciones mencionadas anteriormente del dispositivo, está dedicado al análisis preliminar de muestras sospechosas.

La cámara móvil TruScan RM es un dispositivo perfecto para autenticar previamente el producto. Para obtener resultados confiables del estudio TruScan, se deben usar sustancias de referencia apropiadas. En el caso de probar la autenticidad de los medicamentos, debe tener un medicamento original apropiado.

Desafortunadamente, TruScan puede no mostrar una diferencia entre muestras muy similares. Esto significa que TruScan marcará un falso positivo un medicamento falsificado con un contenido casi idéntico en términos cualitativos y cuantitativos en comparación con el medicamento original. Se recomienda hacer un análisis de exhaustivo con HPLC a los medicamentos analizados con TruScan por lo antes mencionado.

VII. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por bendecirnos y guiarnos en cada paso de nuestra vida, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Gracias a nuestros familiares, en especial a nuestras madres Flor Moncada Gutierrez y Silvia Aguirre Romero, por confiar y creer en nosotras, por los consejos, valores, principios que nos han inculcado y el apoyo incondicional a lo largo de nuestra vida y carrera universitaria.

Agradecemos a nuestros docentes de la Escuela de Farmacia y Bioquímica, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, a nuestra Asesor de tesis y Director de escuela quienes nos han guiado con su paciencia y su rectitud como docentes, y por su valioso aporte para nuestra investigación para lograr nuestros sueños.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FDA. (2010). *FDA. Editado por FDA.* (2010). <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/LawsEnforcedbyFDA/FederalFoodDrugandCosmeticAct/FDCAAct/FDCAActChaptersIandIIShortTitleandDefinitions> (último acceso: 11 de 09 de 2018).
- Fijalek, Z., Poplawska, M., Blazewicz, A., & Bukowinska, K. (2013). Application of high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection for universal quantitation of undeclared phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal dietary supplements. *ELSEVIER*, 2013: 232-243.
- Gratz, S., Flurer, C., & Wolnik, K. (2004). Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase -5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC–ESI–MS and LC–UV. *ELSEVIER*, 2004: 525-533.
- Mas, M. (2015). Bases Moleculares de la Erección, Departamento de Fisiología y Centro de Estudios Sexológicos (CESEX). Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna. Tenerife.España 63 (8): 589-598. Recuperado en 13 de septiembre de 2018, de <http://scielo.isciii.es/pdf/urol/v63n8/04.pdf>
- Newton, PN., Dondorp, A., & Green, M. (2003). Counterfeit artesunate antimalarials in southeast Asia. *PubMed*, 07 2003: 169.
- Odili, V.U., & Osmwenkha, S. (2006). Identification of counterfeit Drugs by Community Pharmacists in Lagos State. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 1 (5 2006): 545-550.
- OMS (1992). <http://www.who.int/medicines/publications/counterfeitguidelines/en/> (último acceso: 14 de 09 de 2018).
- OPS/OMS. (2010). PAHO.ORG. Editado por Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/bulletin/volumes/88/4/10-020410/es/> (último acceso: 3 de 11 de 2018).
- Poplawska, M., Blazewicz, A., Zolek, P., & Fijalek, Z. (2014). Determination of flibanserin and tadalafil in supplements for women sexual desire enhancement using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometer, diode array detector and charged aerosol detector. *ScienceDirect*. 13 de 06 de 2014. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708514000284>.

Pharmaceutical Security Institute. (2006). <http://www.psi-inc.org/therapeuticCategories.cfm> (último acceso: 28 de 10 de 2018).

Tafil-Klawe, M., & Klawe, J.J. (s.f.). Conferencias sobre la fisiología humana. Varsovia, Varsovia: Medical Publishing House

ThermoFisher. *ThermoFisher Scientific*. (2016). www.thermofisher.com.

Welnicki M., A. Mamcarz. (2009) La disfunción eréctil. Tesis Doctoral, Cardiología, Varsovia.

WHO, (1999). Counterfeit Drugs. *WHO, Counterfeit Drugs*. Editado por Counterfeit Drugs. WHO.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/65892/1/WHO_EDM_QSM_99.1.pdf (último acceso: 19 de 09 de 2018).

Zhang, Y., Huang, Z., Ding, L., Yan, H., Wang ., & Zhu S. (2010) Simultaneous determination of yohimbine, sildenafil, vardenafil and tadalafil in dietary supplements using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Wiley Online Library*, 2010: 2109-2114.

Zou, P., Sze-Yin, S., Hou, P., Low, M., & Koh, H. (2006). Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography–elect. *ELSEVIER*, 2006: 113-122.

IX. APENDICE Y ANEXOS



Imagen 1. Obtención y reconocimiento de las muestras



*Imagen 2. Muestras recolectadas para ser enviadas al espectrometro de masas
Agilent 1290 Infinity II*



Imagen 3 y 4. Muestras siendo procesadas en el espectrómetro móvil TruScan RM



Imagen 4, 5 y 6. Muestras siendo procesadas en el espectrómetro de masas Agilent 1290 Infinity II